Aus der chemischen Abteilung des physiologischen Instituts München.

Die Darstellung der Glycerinsäurephosphorsäure und der Glycerinphosphorsäure bei der Umsetzung der Hexosediphosphorsäure durch Hefe.

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
der medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Unversität
zu München

vorgelegt von

Ernst Mehler

München 1938

Pilger-Druckerei G. m. b. H., Speyer a. Rh.

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität zu München.

Referent: Prof. Dr. A. Hahn.

R. UNIV.
BIBLIOTHEEK
LEIDEN

Meinen Eltern

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41554005_0094

Die Darstellung der Glycerinsäurephosphorsäure und der Glycerinphosphorsäure bei der Umsetzung der Hexosediphosphorsäure durch Hefe.

Bekanntlich entstehen beim Abbau der Kohlehydrate als wichtige Zwischensubstanzen die beiden Stoffe Glycerinsäurephosphorsäure und Glycerinphosphorsäure. Nach den bisherigen Darstellungsmethoden war es immer nur möglich, einen der beiden Stoffe präparativ zu gewinnen, während der gleichzeitig entstehende andere verloren ging. Es war also für jeden der in Frage kommenden Substanzen ein besonderer Ansatz notwendig. Zu diesem Nachteil kam hinzu, daß die Darstellung der Glycerinphosphorsäure, z. B. aus Muskel, recht umständlich war und die Ausbeute nur wenig befriedigte. Es sollte deshalb ein Weg gefunden werden, auf dem es möglich ist, die beiden Stoffe gleichzeitig und in einem Arbeitsgang darzustellen. Die Lösung dieser Aufgabe, die unter Berücksichtigung eines nicht zu teueren biologischen Ausgangsmaterials auch hinsichtlich der Ausbeute und Einfachheit der Methode ein befriedigendes Ergebnis ergab, soll durch vorliegende Arbeit dargestellt werden.

Der Vorzug dieser auf biologischem Wege durch den Abbau von Kohlehydraten gewonnenen Substanzen beruht vor allem auf ihrer chemischen Einheitlichkeit, die sich durch die Synthese bisher nicht erreichen läßt. Vielmehr stellen die auf letzterem Wege erhaltenen Produkte ein nicht einheitliches Gemisch ihrer möglichen Isomeren dar, was für die Anwendung zu physiologisch-chemischen Versuchen von gewisser Bedeutung sein kann.

Darstellung.

Die Isolierung der Glycerinsäurephosphorsäure erfolgte in Anlehnung an die Erfahrungen, die Neuberg (1) bei der Gewinnung ihres sauren Bariumsalzes aus Hefe gemacht hatte. Das angegebene Verfahren wurde etwas modifiziert durch eine ein-

geschaltete Fällung der Säure als Bleisalz, wodurch sich ein reineres und besser kristallisierendes Produkt erzielen ließ.

Die Isolierung der Glycerinphosphorsäure erfolgte als Chininsalz, angeregt durch die Versuche von Karrer (2), der die bei der Spaltung des Lezithins entstehende Glycerinphosphorsäure als schwerlösliches Chininglycerinophosphat isolierte.

Zur Darstellung kann man sowohl Trockenhefe als auch Frischhefe verwenden. Bei ersterer stört allerdings etwas der hohe Eiweißgehalt. Es wurde daher, auch der leichteren Beschaffung wegen, der Frischhefe der Vorzug gegeben.

Die Ansätze waren im Anschluß an Neuberg folgendermaßen zusammengesetzt:

1400 g frische Löwenbräuhefe,

1400 ccm Phosphatpuffer (pH : 6,6; $^2/_3$ mol.)
(48,3 g KH_2PO_4 u. 43,0 g $Na_2HPO_4 \cdot 2$ aq. im Liter)

1120 ccm 20%ige Glukoselösung,

1100 ccm 2%ige Lösung von hexodiphosphorsaurem Natrium,

1680 ccm 2%ige Lösung von Azetaldehyd,

280 ccm 0,2 — mol. Natriumfluorid-Lösung (8,4 g im Liter),

150 ccm Toluol.

Die Lösung von hexosediphosphorsaurem Natrium wurde folgendermaßen hergestellt:

24 g hexosediphosphorsaures Kalzium (I.G.Farben) wurden in 300 ccm Wasser suspendiert und mit 10,4 g Oxalsäure, gelöst in 100 ccm Wasser, versetzt. Nach halbstündigem Schütteln auf der Schüttelmaschine wurde auf einem gehärteten Filter das entstandene Kalziumoxalat abfiltriert und auf 1000 ccm mit Wasser aufgefüllt.

Es ist vorteilhaft, vor Zusatz der Hefe zunächst nur die Lösungen des Ansatzes zu vermischen und auf 37° C vorzuwärmen und dann erst die Hefe, unter Verrühren zu einem homogenen Brei, zuzusetzen.

Die Ansätze wurden 3 Stunden bei 37° C im Brutschrank gehalten, wobei häufig zu Anfang sehr stürmische Gärung einsetzte. Es mußte daher während der ersten halben Stunde mehrfach umgerührt werden. Danach wurde die Hefe abzentrifugiert und die überstehende Flüssigkeit durch ein trockenes Faltenfilter filtriert. Das Toluol bleibt auf dem Filter zurück. Die weitere Aufarbeitung erfolgte nach dem folgenden Schema.

1. Schema der Aufarbeitung.

Zusatz von Magnesiumazetat bei ammoniakalischer Reaktion.

↓

Ausfallen der anorganischen Phosphate.
Filtrat hiervon mit Bleiazetat bei essigsaurer Reaktion versetzt.

↓

Ausfallen der Bleisalze von Glycerinsäurephosphorsäure und Glycerinphosphorsäure.

Zersetzung des Bleisalzes mit Schwefelwasserstoff. Vom Bleisulfid abfiltriert. Filtrat hiervon bei essigsaurer Reaktion mit Bariumazetat versetzt.

↓

Ausfallen des sauren Bariumsalzes der Glycerinsäurephosphorsäure.

Filtrat hiervon mit Bleiazetat versetzt.

↓

Ausfallen des Bleisalzes der Glycerinphosphorsäure.

Zersetzung des Bleiniederschlages mit H_2S. Vom Bleisulfid abfiltriert. Filtrat neutralisiert. Versetzt mit Chininhydrochlorid.

↓

Ausfallen des Chininsalzes der Glycerinphosphorsäure.

2. Vorschrift der Aufarbeitung.

Das toluolfreie Filtrat wird bis zur schwach-alkalischen Reaktion gegen Phenolphthalein mit Ammoniak versetzt. Dann gibt man soviel einer konzentrierten Magnesiumazetatlösung hinzu, bis in einer kleinen abfiltrierten Probe kein Niederschlag mehr entsteht, d. h. die Ausfällung der anorganischen Phosphate als Magnesium-Ammoniumphosphat eine vollständige ist. Nach Beendigung der Fällung muß das Filtrat noch schwach alkalisch reagieren, andernfalls die Möglichkeit besteht, daß es noch anorganische Phosphate enthält.

Nach Abfiltrieren des Niederschlags säuert man das Filtrat mit Eisessig an und versetzt es mit einer konzentrierten Lösung von Bleiazetat. Auch hier überzeugt man sich durch abfiltrierte Proben von der Vollständigkeit der Fällung. Der Niederschlag besteht aus den Bleisalzen der Glycerinphosphorsäure und der Glycerinsäurephosphorsäure.

Das Bleisalz filtriert man zunächst auf einem großen Faltenfilter ab und wäscht es mit Wasser aus, indem man es, nach Durchstoßen des Filters, mit Hilfe einer Spritzflasche in einen großen Kolben spült und mit reichlich Wasser aufschlämmt. Alsdann saugt man es auf einer Nutsche ab und wäscht auf dieser nochmals mit Wasser aus. Den Niederschlag bringt man nun in eine genügend große Saugflasche, gibt etwa 1000 ccm Wasser hinzu und schüttelt solange auf der Schüttelmaschine, bis eine homogene Suspension entstanden ist. Dann wird das Bleisalz mit Schwefelwasserstoff zersetzt. Während des Gaseinleitens wird die Saugflasche kräftig geschüttelt, bis kein Gas mehr aufgenommen wird.

Vom entstandenen Bleisulfid wird abfiltriert, und der Niederschlag mit Wasser mehrmals auf dem Filter ausgewaschen. Sollte das Filtrat durch mitgerissenes kolloidales Bleisulfid nicht ganz klar durchgelaufen sein, so fügt man einige ccm Bleiazetatlösung hinzu und sättigt nochmals mit Schwefelwasserstoff. Beim Filtrieren läuft dann das Filtrat stets klar und farblos durch. Filtrat und Waschwasser werden in eine große Gaswaschflasche gefüllt und durch kräftiges Lufteinleiten vom gelösten Schwefelwasserstoff befreit. (Dies soll tunlichst sofort geschehen, da sich bei längerem Stehenlassen im Filtrat störender Schwefel auszuscheiden beginnt.) Von seiner vollkommenen Entfernung kann man sich durch eine Probe mit Bleiazetatpapier überzeugen.

Zum Filtrat werden 500 ccm einer 50%igen Lösung von Bariumazetat zugesetzt. Bei Rühren und Reiben mit dem Glas-

stab an den Wänden des Stutzens beginnt alsbald das saure Bariumsalz der Glycerinsäurephosphorsäure in schönen Kristallen auszufallen. Nach Stehen über Nacht im Eisschrank wird seine Ausscheidung vollständig. Man saugt das Salz ab und wäscht es mehrmals mit Wasser nach.

Die Mutterlauge enthält die Glycerinphosphorsäure, deren Gewinnung zunächst durch ihre Fällung als Bleisalz erfolgt. Man setzt also zur Lösung solange konzentrierte Bleiazetatlösung hinzu, bis die Ausfällung vollständig ist. Nach Abfiltrieren auf einem großen Faltenfilter wird der Niederschlag in einen großen Kolben gespült, mit reichlich Wasser aufgeschwemmt, abgesaugt und nochmals auf der Nutsche mit Wasser gewaschen. Nach Aufschlämmen mit etwa 1 Liter Wasser wird das Bleisalz in einer Saugflasche mit Schwefelwasserstoff zersetzt, das gebildete Bleisulfid abfiltriert und mit Wasser auf dem Filter nachgewaschen. Filtrat und Waschwasser werden durch kräftiges Lufteinleiten vom Schwefelwasserstoff befreit.

Die klare, sauer reagierende Flüssigkeit wird mit 10%iger Natronlauge genau gegen Lackmus neutralisiert. Das Chininsalz der Glycerinphosphorsäure wird alsdann dadurch gefällt, indem man eine Lösung von 75 g Chininhydrochlorid in 2700 ccm Wasser zugibt. Das Salz beginnt sofort auszukristallisieren. Nach Stehen über Nacht im Eisschrank saugt man es auf der Nutsche ab und wäscht mehrmals mit Wasser aus.

3. Ausbeuten.

In zwei Ansätzen wurden folgende Ausbeuten erhalten:
Saures Bariumsalz der Glycerinsäurephosphorsäure: 29 g bzw. 34 g
Chininsalz der Glycerinphosphorsäure: 57 g bzw. 73 g

Theoretisch müßten von beiden Salzen äquivalente Mengen gefunden werden und zwar auf 1 g Bariumsalz 2,33 g Chininsalz. Die Ausbeute an letzterem ist etwas geringer.

4. Umkristallisieren der Rohprodukte.

Das Umkristallisieren des Bariumsalzes der Glycerinsäurephosphorsäure erfolgte nach den Angaben von Lehnartz (3):

Die Rohsubstanz wurde in der 10 fachen Menge Wasser suspendiert und durch tropfenweisen Zusatz von 25%iger Salzsäure in Lösung gebracht. Es wurde durch ein gehärtetes Filter filtriert und das Filtrat solange mit 10%igem Ammoniak versetzt, bis

Kongopapier gerade noch eben blau wurde. Gegen Ende der Neutralisation begann das Salz auszukristallisieren. Es wurde die Hälfte des Volumens Alkohol zugefügt und nach eintägigem Stehen im Eisschrank abgesaugt.

Das Chininsalz der Glycerinphosphorsäure wird aus siedendem Wasser umkristallisiert, wobei zu beachten ist, daß die Substanz dem siedenden Wasser zugesetzt wird und daß die Lösung nicht zu lange erhitzt wird, damit keine Zersetzung eintritt. Nach dem Filtrieren scheiden sich die Kristalle beim Abkühlen der Lösung in feinen Nadeln ab.

5. Analytische Daten.

a) Saures Bariumsalz der Glycerinsäurephosphorsäure.

Es wurde die optische Drehung eines Präparates ermittelt, das im Vakuum über P_2O_5 bei 100° getrocknet worden war.

Zu diesem Zweck wurden 1,616 g der Substanz in 25 ccm 2/n-Schwefelsäure gelöst und vom ausgeschiedenen Bariumsulfat durch ein gehärtetes Filter abfiltriert. Nach Lehnartz enthält das Salz $1^1/_2$ mol. Kristallwasser. Daher entsprechen 1,616 g Bariumsalz 0,854 g freier Säure. Die gefundene Drehung war $\alpha = -0°, 81$. Daraus berechnet sich für die Glycerinsäurephosphorsäure:

$$aD = - \frac{0{,}81 \cdot 25}{2 \cdot 0{,}854} = -11°{,}84$$

Lehnartz fand den Wert —11°,30, während Neuberg (4) den Wert —13°,75 angibt.

b) Chininsalz der Glycerinphosphorsäure.

Die Substanz war bei Zimmertemperatur im Hochvakuum getrocknet worden.

S. P. 150° (Karrer: 155°).

Die Analysen ergaben:

1. 3,316 mg Subst. 0,195 ccm N. (753 mm; 25°)
   Gefunden: 6,67 % N.
2. 2,895 mg Subst. 0,174 ccm N. (755 mm; 25°)
   Gefunden: 6,84 % N.
   Berechnet: 6,78 % N.

Formel: $(C_{20}H_{24}N_2O_2)_2C_3H_9O_6P$ (820).

Die Bestimmung der optischen Drehung wurde mit Substanzen vorgenommen, die bei Zimmertemperatur im Vakuum über P_2O_5 getrocknet waren. S. P. 152° (Karrer: 155°). Als Lösungsmittel diente absoluter Alkohol. Es wurde ein 40 cm-Rohr benutzt.

1. 0,3714 g Subst. gelöst in 100 ccm abs. Alkohol.

$$\alpha = -2°,1$$

$$\alpha D = -\frac{2,1 \cdot 100}{4 \cdot 0,3714} = -141°,4$$

2. 0,2470 g Subst. gelöst in 70 ccm Alkohol.

$$\alpha = -1°,99$$

$$\alpha D = -\frac{1,99 \cdot 70}{4 \cdot 0,247} = -141°,0.$$

Karrer gibt für $\alpha D = -144°,7$ an.

Die Löslichkeit des Chininsalzes beträgt 0,053 g in 100 ccm Wasser bei 20°.

6. Herstellung einer Lösung des Natriumsalzes der Säuren.

Da im allgemeinen für physiologische Versuche die Natriumsalze beider Säuren zur Verwendung kommen, soll hier die Herstellung ihrer Lösungen beschrieben werden:

a) Glycerinsäurephosphorsäure.

Man suspendiert das saure Bariumsalz in Wasser und setzt tropfenweise bis zur vollständigen Lösung konz. Salzsäure zu. Dann fügt man mit einem ganz geringen Überschuß, für 1 g Salz 3 ccm n/1-Säure, hinzu. Das ausgeschiedene Bariumsulfat wird durch ein gehärtetes Filter abfiltriert und das Filtrat mit Natronlauge genau neutralisiert.

b) Glycerinphosphorsäure.

Die Herstellung des Natriumsalzes der Glycerinphosphorsäure erfolgt durch Zersetzen des Chininsalzes mit Natronlauge.

1 g Chininsalz entspricht 0,211 g freier Säure.

Das Salz wird in der 20 fachen Menge Wasser suspendiert und mit der berechneten Menge n/1-Natronlauge, auf 1 g Chininsalz 2,44 ccm Lauge versetzt. Nach halbstündigem Schütteln filtriert

man von der ausgeschiedenen freien Chininbase ab, schüttelt das Filtrat mit Chloroform aus, um die letzten Reste von Chinin zu entfernen. Schließlich neutralisiert man mit n/1-Salzsäure. Ist eine höhere Konzentration erforderlich, so kann man die Lösung im Vakuum bei 40° einengen.

Um sich von der Vollständigkeit der Umsetzung zu überzeugen, wurde folgender Versuch angestellt:

4,813 g Chininsalz wurden in 100 ccm Wasser suspendiert und mit 11,7 ccm n/1-Natronlauge versetzt. Die ausgeschiedene freie Chininbase wurde abfiltriert, getrocknet und gewogen. Gefunden wurden 3,74 g, berechnet 3,79 g freies Chinin.

7. Chininsalz der Glycerinsäurephosphorsäure.

Um Aufschluß über die Löslichkeit des möglicherweise entstehenden, bisher noch nicht dargestellten Chininsalzes der Glycerinsäurephosphorsäure zu erhalten, wurde seine Herstellung auf dem Wege über das saure Bariumsalz der Säure versucht. Wie folgender Versuch zeigt, gibt auch sie ein Chininsalz.

Eine abgewogene Menge des sauren Bariumsalzes wurde in wenig Wasser suspendiert und bis zur Lösung tropfenweise mit 20%iger Salzsäure versetzt. Durch Zusatz der berechneten Menge Schwefelsäure wurde das Barium als Sulfat gefällt und abfiltriert, dann das Filtrat mit Natronlauge neutralisiert. Nach Zusatz der berechneten Menge Chininhydrochloridlösung kristallisierte das Salz nach mehrstündigem Stehen in schönen langen Nadeln aus. Der S. P. liegt bei 199°.

Die Löslichkeit beträgt 0,43 g in 100 ccm Wasser von 20°. Sie ist also etwa 10 mal größer als die des Chininsalzes der Glycerinphosphorsäure.

Am Schlusse meiner Arbeit möchte ich hiermit Herrn Prof. Dr. Hahn für die Überlassung der Arbeit meinen herzlichsten Dank aussprechen.

Literatur.

1) Vercellone u. Neuberg, Biochem. Z. 280, 160 (1935).
2) Karrer u. Salomon, Helvet. Chim. Act. 9. 14 (1926).
3) Lehnartz, H. S. 230, 90 (1934).
4) Neuberg u. Kobel, Biochem. Z. 263, 219 (1933).

Lebenslauf.

Ich wurde am 21. Juli 1911 in München als Sohn des Chemikers Dr. Ludwig Mehler und seiner Ehefrau Babette geb. Rüger, geboren. Nachdem ich die Volksschule in Nürnberg und München, die Mittelschule in Leverkusen besucht hatte, kam ich auf das Realgymnasium zu Opladen, 1926 auf das Reformrealgymnasium zu Neuss a. Rh., wo ich im Februar 1931 die Reifeprüfung ablegte. Im Sommersemester des gleichen Jahres begann ich in München das Studium der Medizin. Hier bestand ich nach fünf Semestern das Physikum und legte nach weiteren sieben klinischen Semestern im Juli 1937 das ärztliche Staatsexamen ab.

PILGER
DRUCK